

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23233

研究課題名(和文)新規RB抑制因子GGCTの阻害による「RB活性化がん予防法」の開発

研究課題名(英文)Development of a novel cancer prevention methods targeting GGCT by "RB reactivation screening".

研究代表者

谷口 恵香(Taniguchi, Keiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70882942

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文): 本研究は、がん細胞に高発現するタンパク質GGCTの発現抑制が、『がん抑制遺伝子RB』を再活性化する機構を解明するのが目的である。

成長因子受容体ファミリーに属するc-Metの発現が、GGCT発現抑制によって顕著に低下することを発見した。また、GGCT発現抑制によるRB再活性化は、AMPKの活性化を介したc-Met発現低下に依存していることを示した。さらに、AMPKの下流でc-Metの発現を調節している転写因子STAT3が不活性化されていることを見出した。

以上の結果より、GGCT発現抑制はAMPKを介してSTAT3-c-Met経路を不活性化することにより、RBを再活性化することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の死因第1位であるがんを「予防」することは喫緊の課題である。多くの研究報告から、『がん抑制遺伝子RB』を再活性化させることはがんの予防に非常に有用であると考えられている。我々は、がん細胞に高発現するタンパク質GGCTの発現抑制がRBを再活性化することを新たに見出し、その詳細な分子機構を解明した。

本研究は、GGCT発現抑制によるRB再活性化機構を明らかにした最初の研究である。さらに現在、本研究で得られた結果を基にしたGGCT阻害剤のスクリーニングを計画しており、GGCTを標的としたがん予防法の開発へ直結すると考えられる。したがって、学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文): The purpose of this study is to elucidate the mechanism by which depletion of γ -glutamylcyclotransferase (GGCT), a highly expressed protein in cancer cells, activates a tumor suppressor gene "RB".

The expression of c-Met, a receptor tyrosine kinase which promotes cancer growth, was decreased by depletion of GGCT. We also showed that RB activation by depleting GGCT depends on the downregulation of c-Met via activation of AMPK. Furthermore, we found that STAT3, a transcription factor which regulates c-Met expression, is inactivated by depletion of GGCT in an AMPK-dependent manner.

These results suggest that depletion of GGCT activates RB by inhibiting the STAT3-c-Met pathway via AMPK activation.

研究分野：がん分子生物学

キーワード： γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ GGCT がん予防 RB

1. 研究開始当初の背景

本邦の死因第一位である「がん」を予防することは、国民の死亡率を減少させることに直結する。我々の研究室では、『がん抑制遺伝子 RB』の再活性化に着目したがん予防法の開発研究を続けてきた。細胞周期の中心的な制御因子である RB が失活すると、細胞の無秩序な増殖が引き起こされ、その結果、発がんに至ると考えられている。RB は様々ながん種で失活しており、RB の再活性化を引き起こしうる標的分子を探索することは、幅広いがん種に対する予防戦略の開発へと繋がる [1]。

我々は、ヒトがん細胞において、『 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT)』という分子の発現を抑制すると、RB が再活性化されることを新規に見出した。 γ -グルタミルサイクル中で働く代謝酵素である GGCT は、様々な悪性腫瘍組織で高発現しており、その発現抑制が腫瘍の成長を阻害することが報告されている [2]。さらに近年、GGCT の遺伝子欠損が KRAS 誘導性の肺がんモデルマウスにおける発がんを抑制することが報告された [3]。したがって、GGCT はがんの有望な治療標的および予防標的であると考えられているが、その分子機構は十分に明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GGCT 発現抑制による RB 再活性化の分子機構を解明し、新規がん予防戦略の開発へと繋がる知見を得ることである。

我々は、GGCT の発現抑制が、RB の活性を抑制している MEK-ERK 経路の阻害を引き起こすことを見出した [4]。すなわち、GGCT は MEK-ERK 経路を活性化することにより RB の活性を抑え、発がんを引き起こしている可能性が考えられた。そこで本研究では、GGCT 発現抑制が MEK-ERK 経路阻害および RB 再活性化を引き起こす詳細な分子機構を解明する。その成果を、所属研究室の研究プロジェクトである「RB 再活性化がん予防法の開発」の一環として、GGCT を標的とした新規『がん分子標的予防戦略』の構築につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

DNA マイクロアレイを用いた予備実験により、GGCT が c-Met の発現を誘導する可能性を新たに見出した。c-Met は、MEK-ERK 経路の上流で細胞生存シグナルを制御する受容体チロシンキナーゼファミリーの分子であり、がん細胞における無秩序な増殖を促進する。

GGCT 発現抑制による MEK-ERK 経路抑制および RB 再活性化が、この c-Met の発現低下に依存するという仮説のもと、c-Met 強制発現細胞を樹立した。この細胞に対し、siRNA を用いて GGCT の発現を抑制した際に、MEK-ERK 経路抑制および RB 再活性化が減弱されるかどうかを、ウェスタンブロット法を用いて検討した。さらに、c-Met の発現を上流で調節する分子として STAT3 および AMPK が関与している可能性を考え、阻害剤および siRNA を用いてこれらの分子の影響を検討した。

また、代謝酵素 GGCT の過剰発現によって引き起こされる代謝経路の変化について、細胞外フラックスアナライザーを用いた解析を行った。

4. 研究成果

前立腺がん細胞 PC3 および肺がん細胞 A549 を含む複数のがん細胞株において、GGCT の発現抑制が RB を再活性化すること、MEK-ERK 経路を阻害していることを確認した。次に、これらのがん細胞株に対する GGCT 発現抑制が、タンパク質レベルおよび mRNA レベルで c-Met の発現を低下させることを示した (図 1)。さらに、c-Met を強制発現することにより、GGCT 発現抑制による RB 再活性化 (脱リン酸化) および MEK-ERK 経路の阻害が減弱されることを明らかにした (図 2)。

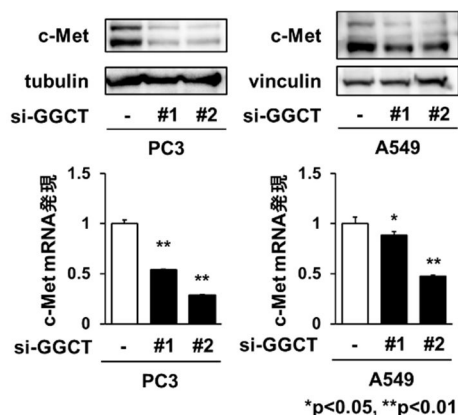


図1 GGCT発現抑制はc-Metの発現を低下させる

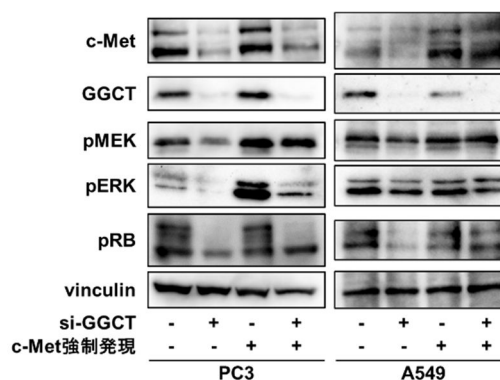


図2 c-Met強制発現はGGCT発現抑制によるMEK-ERK経路不活性化およびRB再活性化(脱リン酸化)を減弱する

多くのがんで活性化されている転写因子 STAT3 は、c-Met のプロモーター領域に結合し、その発現を促進することが報告されている [5]。実際に、PC3 細胞に対する STAT3 阻害剤 Stattic の投与が、STAT3 リン酸化および c-Met 発現を抑制することを確認した。さらに、GGCT のノックダウンは STAT3 リン酸化レベルを減少させ、核内 STAT3 の発現を抑制することを見出した(図 3)。

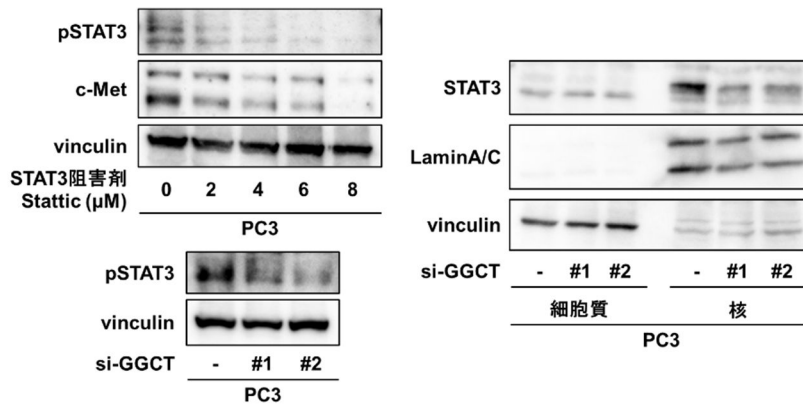


図3 GGCT発現抑制はSTAT3リン酸化を抑制し、核内発現を低下させる

GGCT の発現抑制によって AMPK が活性化されることを以前に報告した [6]。AMPK は mTOR 経路を抑制している [7]。また、STAT3 は mTOR 経路の活性化によってリン酸化され、転写因子として活性化されることが報告されているため [8]、GGCT 発現抑制は AMPK の活性化を介して STAT3 機能を抑制しているという可能性を考えた。そこで、siRNA を用いて AMPK の発現を抑制したところ、GGCT 発現抑制による STAT3 リン酸化レベルの減少が回復した。さらに、GGCT 発現抑制による c-Met-MEK-ERK 経路の阻害および RB 再活性化が、AMPK siRNA 投与によって減弱されることを発見した(図 4)。

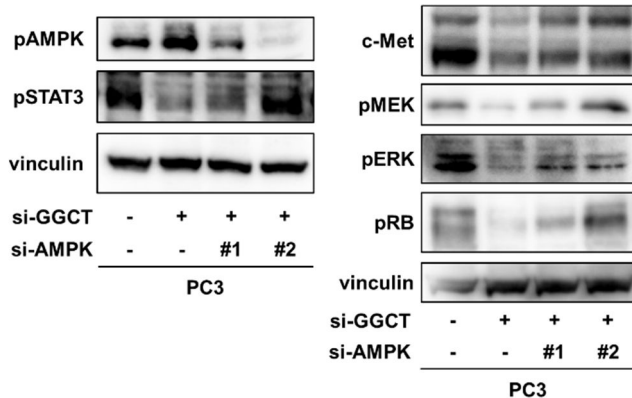


図4 GGCT発現抑制によるpSTAT3低下、c-Met-MEK-ERK経路不活性化およびRB再活性化は、AMPKに依存している

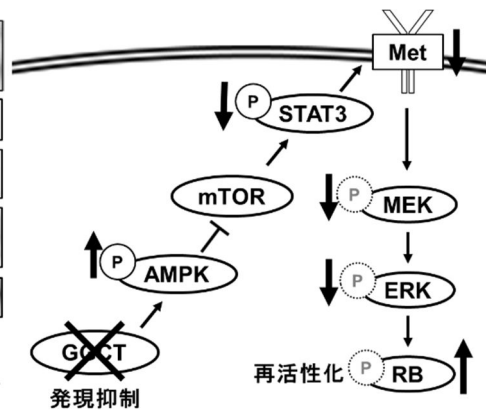


図5 GGCT発現抑制によるRB再活性化の分子機構

以上の結果より、GGCT 発現抑制は AMPK を介して転写因子 STAT3 を不活性化し、c-Met 発現を低下させる可能性が示唆された。そして、c-Met 下流の MEK-ERK 経路の阻害を引き起こし、RB を再活性化すると考えられる(図 5)。本研究は、がん予防に重要な役割を果たす『がん抑制遺伝子 RB』を再活性化する標的分子 GGCT を見出し、その機構を明らかにした初めての研究である。

一方で我々は、代謝酵素である GGCT が、転写因子 HIF-1 および下流の解糖系酵素の発現上昇を引き起こし、がん細胞の特徴の一つである「好氣的解糖」を誘導する因子であることを報告した [4]。がん細胞の代謝に GGCT の果たす役割をさらに詳細に解明するために、細胞外フラックスアナライザーを用い、細胞のプロトン流出速度(解糖系の指標)および酸素消費速度(ミトコンドリア呼吸鎖の指標)を経時的に解析した(図 6, 次頁)。その結果、GGCT を強制発現させた NIH3T3 細胞では、基底状態の解糖能(図 6 内[a]) およびミトコンドリア呼吸鎖阻害時に上昇する代償性解糖能(図 6 内[b]) が顕著に上昇していた。加えて、ミトコンドリア呼吸鎖が顕著に抑制されていることを明らかにした(図 6 内[c])。したがって GGCT は、細胞のエネルギー産生系をミトコンドリア呼吸鎖から解糖系へと切り替え、代謝リプログラミングを引き起こす新規因子であることが示唆された。

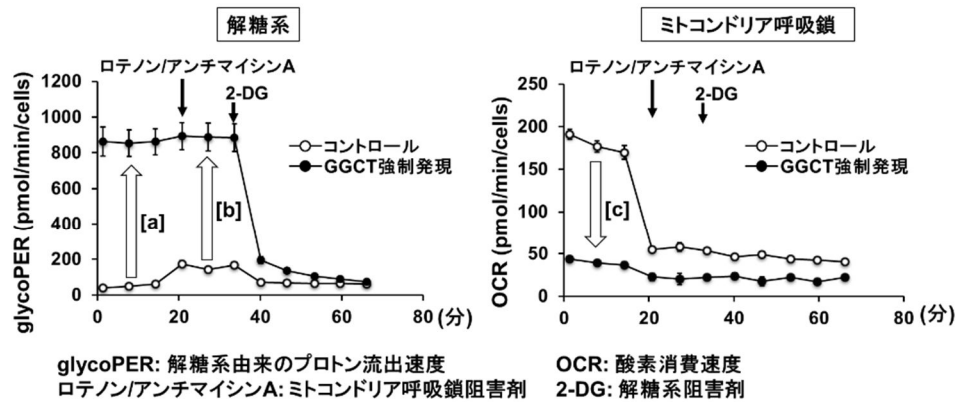


図6 GGCTは解糖系を促進し、ミトコンドリア呼吸鎖を抑制する

<引用文献>

- [1] 酒井敏行, 日衛誌. 2011; 66:3-12.
- [2] Kageyama S, Ii H, Taniguchi K, Kubota S, Yoshida T, Isono T, Chano T, Yoshiya T, Ito K, Yoshiki T, Kawauchi A, Nakata S. Mechanisms of tumor growth inhibition by depletion of γ -glutamylcyclotransferase (GGCT): A novel molecular target for anticancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018; 19:2054.
- [3] He Z, Wang S, Shao Y, Zhang J, Wu X, Chen Y, Hu J, Zhang F, Liu XS. Ras downstream effector GGCT alleviates oncogenic stress. *iScience*. 2019; 19:256-266.
- [4] Taniguchi K, Kageyama S, Moyama C, Ando S, Ii H, Ashihara E, Horinaka M, Sakai T, Kubota S, Kawauchi A, Nakata S. γ -Glutamylcyclotransferase, a novel regulator of HIF-1 expression, triggers aerobic glycolysis. *Cancer Gene Ther*. 2022; 1:37-48.
- [5] Zhu Y, Zhang H, Han X, Wang Z, Cui Y, Tian R, Wang Z, Han B, Tian J, Zhang F, Niu R. STAT3 mediated upregulation of C-MET signaling acts as a compensatory survival mechanism upon EGFR family inhibition in chemoresistant breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2021; 519:328-342.
- [6] Taniguchi K, Matsumura K, Ii H, Kageyama S, Ashihara E, Chano T, Kawauchi A, Yoshiki T, Nakata S. Depletion of gamma-glutamylcyclotransferase in cancer cells induces autophagy followed by cellular senescence. *Am J Cancer Res*. 2018; 8:650-661.
- [7] Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008; 30:214-226.
- [8] Yokogami K, Wakisaka S, Avruch J, Reeves SA. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Curr Biol*. 2000; 10:47-50.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Moyama Chiami, Fujita Mitsugu, Ando Shota, Taniguchi Keiko, Ii Hiromi, Tanigawa Seisuke, Hashimoto Naoya, Nakata Susumu	4. 巻 12
2. 論文標題 Stat5b inhibition blocks proliferation and tumorigenicity of glioblastoma stem cells derived from a de novo murine brain cancer model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1129 ~ 1142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Hiroko, Moyama Chiami, Taniguchi Keiko, Ando Kota, Matsuda Ryohei, Ando Shota, Ii Hiromi, Kageyama Susumu, Kawauchi Akihiro, Chouha Nora, D saubry Laurent, Nakata Susumu	4. 巻 101
2. 論文標題 Fluorizoline blocks the interaction between prohibitin-2 and -glutamylcyclotransferase and induces p21Waf1/Cip1 expression in MCF7 breast cancer cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 78 ~ 86
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/molpharm.121.000334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi Keiko, Kageyama Susumu, Moyama Chiami, Ando Shota, Ii Hiromi, Ashihara Eishi, Horinaka Mano, Sakai Toshiyuki, Kubota Shigehisa, Kawauchi Akihiro, Nakata Susumu	4. 巻 29
2. 論文標題 -Glutamylcyclotransferase, a novel regulator of HIF-1 expression, triggers aerobic glycolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 37 ~ 48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-020-00287-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金田裕太、茂山千愛美、吉井陸、安藤孝太、松田凌平、安藤翔太、高木寛子、谷口恵香、飯居宏美、中田晋
2. 発表標題 Fluorizolineによるがん細胞増殖抑制効果にはp21Waf1/Cip1誘導が関与する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯居宏美、高木寛子、谷口恵香、茂山千愛美、安藤翔太、吉矢拓、野原由江、増田駿、津田修吾、影山進、中田晋
2. 発表標題 -グルタミルシクロトランスフェラーゼ阻害剤pro-GAIはMCF7担癌マウスにおいて抗腫瘍効果を示す
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 飯居宏美、高木寛子、谷口恵香、吉矢拓、影山進、中田晋
2. 発表標題 新規 -グルタミルシクロトランスフェラーゼ酵素活性阻害剤のMCF7乳がん細胞担癌マウスにおける抗腫瘍効果とそのがん細胞増殖抑制機構の解明
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤孝太、松田凌平、高木寛子、谷口恵香、飯居宏美、中田晋
2. 発表標題 FluorizolineのMCF7乳がん細胞増殖抑制効果に対するp21Waf1/Cip1誘導の寄与
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口恵香、影山進、茂山千愛美、安藤翔太、飯居宏美、芦原英司、堀中真野、酒井敏行、窪田成寿、河内明宏、中田晋
2. 発表標題 新規がん予防標的GGCTIは、がん細胞にHIF-1 発現を誘導しワールブルク効果を促進する
3. 学会等名 第20回分子予防環境医学研究会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口恵香、影山進、茂山千愛美、安藤翔太、飯居宏美、芦原英司、堀中真野、酒井敏行、河内明宏、中田晋
2. 発表標題 新規がん予防標的GGCTは、がん細胞にHIF-1 発現を誘導して好気性解糖を促進する
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯居宏美、谷口恵香、高木寛子、茂山千愛美、安藤翔太、芦原英司、中田晋
2. 発表標題 GGCT阻害により誘導される乳がんまたは造血器腫瘍細胞増殖抑制はN-アセチルシステイン添加により回復する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------